

史文军, 万夕和, 陈海泉, 等. 脊尾白虾抗白斑综合征病毒群体初步选育及重要免疫酶活性分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 126–128. doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2017.03.035

脊尾白虾抗白斑综合征病毒群体初步选育及重要免疫酶活性分析

史文军¹, 万夕和¹, 陈海泉², 乔毅¹, 沈辉¹, 王李宝¹, 黎慧¹

(1. 江苏省海洋水产研究所, 江苏南通 226007; 2. 江苏省海洋渔业指挥部, 江苏南通 226006)

摘要:以脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda* Holthuis)为试验材料,以人工连续 7 d 投喂携带白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)的死虾为攻毒方式,得抗性试验组(Rm);以人工连续 7 d 投喂不携带 WSSV 的死虾为对照方式,得对照试验组(Vm),待存活率稳定后,分析比较抗性试验组 and 对照试验组的存活率及酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)和酚氧化酶(PO)活性的差异性;然后待 Rm 组中雌性脊尾白虾卵接近孵化时,挑选 40~50 尾体格较大的抱卵雌虾,分别放入事先准备好的桶中,让其自然孵化,以此得 Rm1 代;孵化完成后,收集各组亲虾并编号,用套式 PCR 法检测各组亲虾 WSSV 携带情况,将阴性组及虾卵孵化较少组淘汰,留下 20 组,重新编号 Rm1 代,然后将其喂养成成虾;以此方式连续选育得到 Rm3 代。用同样方法对 Rm3 代成虾和自然环境中 WSSV 携带成虾(Vn)进行攻毒试验,然后检测结果显示 Rm3 代成虾比 Vn 成虾存活率要高出很多且免疫相关酶活性之间存在显著性差异。

关键词:脊尾白虾;白斑综合征病毒;抗病群体;免疫相关酶

中图分类号: S945.4⁺99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2017)03–0126–03

我国是虾类养殖大国,但是随着养殖业的快速扩张,养殖环境恶化、种苗退化和病害高发等因素严重制约了产业的发展^[1–2]。其中,虾类病害越来越严重,白斑综合征(white spot syndrome, WSS)的暴发给虾类养殖带来严重损失,这种病毒在虾类个体间可以经口传播,虾类感染后,死亡率极高^[3–6]。因此选育出具有一定抗性的群体及对相关免疫酶活性的研究具有重要意义。虾类主要依靠非特异性免疫系统进行自身的免疫防御,其中酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)和酚氧化酶(PO)常被用于衡量虾类的免疫状态、健康状态以及筛选抗病家系等^[7–9]。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda* Holthuis)属于甲壳亚门十足目长臂虾科白虾属,其环境适应力强、世代周期短且易于人工条件下周年繁殖,是我国常见虾类养殖经济品种^[10]。另一方面,脊尾白虾对 WSSV 敏感性高,在养殖过程中感染 WSSV 后死亡率极高,容易造成严重的养殖损失。本研究以脊尾白虾为试验材料,通过投喂携带 WSSV 的死虾为攻毒方式,连续进行 3 代选育;并分析抗性试验组与对照试验组存活率及 ACP、AKP、SOD 和 PO 活性的差异,探讨初步选育具有一定抗 WSSV 的脊尾白虾群体并研究相关免疫酶的活性变化。

1 材料与方法

1.1 试验动物和病毒携带虾来源

试验所用脊尾白虾:2014 年 3 月于江苏省东台市脊尾白虾养殖区选取经套式 PCR 法检测 WSSV 携带情况为阴性池塘内的虾,体长为(4.8±0.5) cm,体质量为(1.9±0.4) g;试验用病毒携带死虾:2013 年 6 月于江苏省东台市脊尾白虾养殖区选取大规模死亡后经套式 PCR 法检测 WSSV 携带情况为阳性池塘内的虾,迅速冷藏运回实验室,并存储于–80℃冰柜中待用;试验用自然环境病毒携带虾:2015 年 6 月于江苏省东台市脊尾白虾养殖区选取经套式 PCR 法检测 WSSV 携带情况为阳性池塘内的活体成虾,平均体长为(5.1±0.3) cm,平均体质量为(2.1±0.5) g。

1.2 WSSV 攻毒试验

1.2.1 抗 WSSV 群体的获得 将试验用脊尾白虾用活水产运输至江苏省海洋水产研究所吕四养殖试验基地,按约 5:1 分为试验组和对照组(1 000 尾:200 尾),适应性暂养 7 d,期间正常投喂事先检测不携带 WSSV 的颗粒饵料并及时捞出死虾及残饵,待两组虾稳定后;向试验组投喂携带 WSSV 的死虾,向对照组投喂不携带 WSSV 的死虾,每日早晚各投喂 1 次并及时捞出残饵及死虾,根据前日残饵量及时调整投喂量,连续投喂 7 d,得到 0 代试验组(Rm0)和对照组,以后按正常的管理方法进行换水和投喂颗粒饵料。每天观察虾的存活情况,及时捞出并记录死虾数量,待试验组虾存活情况稳定后,分析比较试验组和对照组的存活率及 ACP、AKP、SOD 和 PO 活性的差异性;然后待 Rm0 组中雌性脊尾白虾卵接近孵化(虾卵成亮白色,黑色眼点明显可见)时,挑选 40~50 尾体格较大抱卵雌虾,分别放入事先准备好的桶中,让其自然孵化,

收稿日期:2016–10–08

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(13)2040]。

作者简介:史文军(1987—),男,安徽寿县人,硕士,工程师,主要从事海洋生物技术研究。E-mail: muzhiye080326@126.com。

通信作者:万夕和,博士,研究员,主要从事海洋生物研究。Tel: (0513)85228266; E-mail: wxh1708@163.com。

以此得 Rm1 代;孵化完成后,收集各组亲虾并编号,用套式 PCR 法检测各组亲虾 WSSV 携带情况,将阴性组及虾卵孵化较少组淘汰,留下 20 组,重新编号 Rm1 代,然后将其喂养成成虾;按以上方法连续攻毒选育得到 Rm3 代。

1.2.2 攻毒对 Rm3 和 Vn 的影响比较 为检验经历 WSSV 连续感染淘汰后, Rm3 代脊尾白虾成虾是否比自然环境中病毒携带虾(Vn)的抗性强,并检测相关免疫酶活性变化情况,进行如下试验:从 20 组 Rm3 代脊尾白虾成虾中随机挑选 150 尾,并随机分为 3 组,每组 50 尾;另外随机挑选 Vn 组脊尾白虾成虾 150 尾,随机分为 3 组,每组 50 尾。向 6 组中分别投喂携带 WSSV 的死虾,每日早晚各投喂 1 次并及时捞出残饵,根据前日残饵量及时调整投喂,连续投喂 7 d,以后按正常的管理方法进行换水和投喂颗粒饵料。每天观察虾的存活情况,及时捞出并记录死虾数量,待虾存活情况稳定后,分析比较 Rm3 代组和 Vn 组的存活率及 ACP、AKP、SOD 和 PO 活性的差异性。

1.3 WSSV 携带情况检测

为检测脊尾白虾 WSSV 携带情况,本试验采用套式 PCR 法,具体操作过程参照 GB/T 28630. 2—2012《白斑综合征(WSD)诊断规程 第 2 部分:套式 PCR 检测法》。

1.4 总蛋白质的提取及酶活检验

将所取脊尾白虾的头胸部取下作为样品,于液氮中进行研磨至均匀细致的粉末,用于相关免疫酶活性检测^[10]。酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)和酚氧化酶(PO)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,分别按试剂盒使用说明检测脊尾白虾中免疫相关酶活性。研磨细碎的粉末中总蛋白的含量采用 Bradford 法^[11]测定。

1.5 数据处理

所有数据均采用平均值表示,且每组不少于 3 个平行,采用 SPSS 软件对数据进行分析,若 $P < 0.05$,表示试验组与对照组之间存在显著性差异。

2 结果与分析

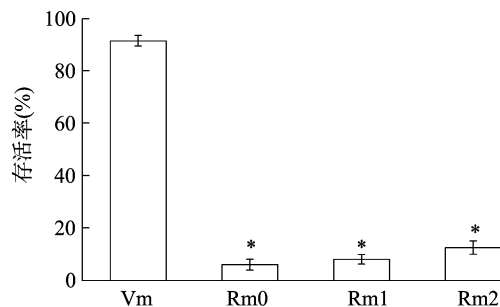
2.1 脊尾白虾耐受群体的获得

脊尾白虾抗 WSSV 群体由 Rm0 代到 Rm3 代共经历 3 次

攻毒,每次攻毒后,试验组脊尾白虾均出现大批量死亡,对试验组和对照组的死虾采用套式 PCR 法进行 WSSV 携带情况检测,结果显示抗性试验组死亡的脊尾白虾随机抽样都检测到 WSSV 阳性,说明其死亡原因可能由 WSSV 感染所致;而对照组死亡的脊尾白虾随机抽样都未检测到 WSSV,说明其死亡原因并非 WSSV 感染所致。

2.2 Rm0 ~ Rm2 代及 Vm 群体存活率和免疫相关酶活性差异

通过统计计算每次攻毒至稳定后 Rm0 ~ Rm2 代和 Vm 的脊尾白虾存活率,结果见图 1。Vm 中脊尾白虾平均存活率达到 91.60%,而 Rm0 脊尾白虾几乎完全死亡,平均存活率只有 6.07%;Rm2 中脊尾白虾存活率略有提高,达到 12.60%,Rm0 ~ Rm2 代和 Vm 的存活率均存在显著性差异($P < 0.05$)。



*表示与Vm存在显著性差异($P < 0.05$)。图 2 同

图1 攻毒至稳定后脊尾白虾存活率比较

利用酶活检测试剂盒对每次攻毒至稳定后 Rm0 ~ Rm2 代和 Vm 的脊尾白虾 ACP、AKP、SOD 和 PO 的活性进行检测,结果见图 2。由图 2 可以看出随着攻毒次数的增加,4 种免疫相关酶在脊尾白虾体内的酶活力均呈下降趋势,其中 ACP 和 PO 的下降趋势明显、AKP 下降趋势次之、SOD 下降趋势最弱;但随着攻毒次数的增加,Rm2 代脊尾白虾体内 4 种免疫相关酶活力均显著低于 Vm 中的酶活($P < 0.05$)。

2.3 攻毒后 Rm3 及 Vn 群体存活率和免疫相关酶活性差异

参照上述的试验方法及检测方法,分析比较 Rm3 和 Vn 群体在攻毒后的差异性,结果见图 3。由图 3 可以看出经过

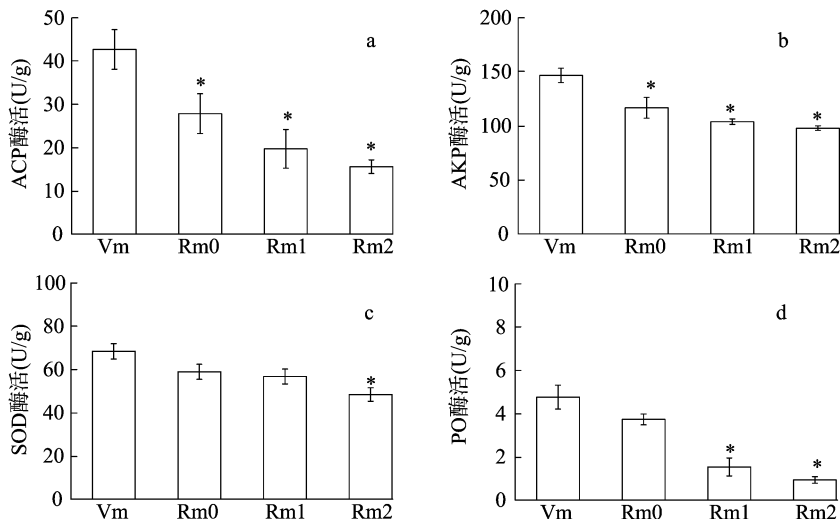


图2 攻毒至稳定后脊尾白虾体内酸性磷酸酶(a)、碱性磷酸酶(b)、超氧化物歧化酶(c)和酚氧化酶(d)活性比较

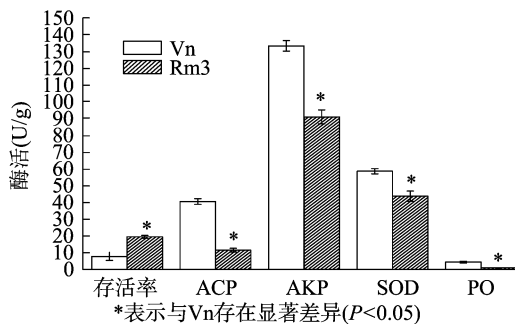


图3 攻毒至稳定后 Vn 及 Rm3 存活率和免疫相关酶活性比较

WSSV 连续攻毒选育后得到的 Rm3 比 Vn 对经口感染 WSSV 的耐受力要高;4 种免疫相关酶 ACP、AKP、SOD 和 PO 在 Rm3 和 Vn 之间均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

虾类抗病群体或家系选育研究是目前国际上良种选育的重要方向。在我国,对虾类抗病群体或家系选育研究也较为普遍,如朱其建等进行了抗溶藻弧菌罗氏沼虾群体的选育^[12]、黄永春等进行了抗 WSSV 凡纳滨对虾家系的选育^[13-14]以及王专伟^[15]和张涛^[16]进行了抗 WSSV 斑节对虾家系的选育等。本研究以人工感染的方式对脊尾白虾进行了连续 3 次攻毒,将其中低耐受力个体淘汰,最终存活下来的群体被认为是对 WSSV 具有高耐受力的脊尾白虾群体;对 Rm3 和 Vn 群体在攻毒后的差异性比较结果也进一步说明了这一选育方法的可靠性。当然,想要最终得到一种高抗 WSSV 的脊尾白虾新品种,选育的世代仍需继续延续下去,但这种抗性能否稳定遗传仍需要通过分子生物学手段分析其进化关系来确定。

甲壳类动物主要依靠非特异性免疫系统进行免疫防御,其中免疫蛋白质起到至关重要的作用。Chen 等^[17]、Sung 等^[18]和 Qin 等^[19]的研究中均将 ACP 和 AKP 用作免疫能力变化的相关指标;在 Fridovich^[20]和 Johansson 等^[21]的研究中分别将 SOD 和 PO 作为免疫能力变化的相关指标。本研究中,选取 ACP、AKP、SOD 和 PO 这 4 种免疫相关酶作为脊尾白虾攻毒稳定后,体内免疫能力变化的指标。由 Rm0 代到 Rm2 代,4 种免疫酶活力均呈现下降趋势,这与王专伟等^[9]、冯宁宁等^[10]、张涛^[16]和张曼等^[22]研究 WSSV 对不同种虾类免疫酶活性的影响相似;但在本试验中,虽然 Rm2 代 4 种免疫酶最终与 Vn 均存在显著性差异,但 ACP、AKP 和 PO 的变化趋势更为显著,而 SOD 的变化趋势较小;所以在脊尾白虾对 WSSV 抗性强弱方面,ACP、AKP 和 PO 这 3 种免疫相关酶活性的高低更具有指示性;但是否能真正作为脊尾白虾对感染 WSSV 的主要免疫指标还需进行更加深入的研究。在 Rm3 代与 Vn 存活率及免疫相关酶活性比较分析中可以看出,经过连续的攻毒选育,Rm3 代成虾比 Vn 成虾对 WSSV 的抗性有所提高,免疫相关酶活性的变化也与前期研究具有一致性。

参考文献:

[1] Inouye K, Miwa S, Oseko N, et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus[J]. Fish Pathology, 1994, 29: 149 - 158.

[2] 蔡生力, 黄捷, 王崇明, 等. 1993—1994 对虾暴发病的流行病学研究[J]. 水产学报, 1995, 19(2): 112 - 119.

[3] 刘萍, 孔杰, 李健, 等. 白斑综合征病毒 (WSSV) 对中国对虾卵及各期幼体人工感染的试验研究[J]. 海洋水产研究, 2001, 22(1): 1 - 6.

[4] Li F H, Xiang J H. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2012, 39(1/2): 11 - 26.

[5] 黄捷, 杨丛海, 于佳, 等. T-E 染色法用于对虾暴发性流行病的现场快速诊断[J]. 海洋科学, 1995, 19(1): 29 - 33.

[6] 何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合征杆状病毒的感染途径和宿主种类[J]. 中山大学学报, 1999, 38(2): 65 - 69.

[7] 何南海. 对虾免疫功能指标的简历及其应用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43(3): 385 - 388.

[8] 魏克强, 许梓荣. 对虾的免疫机制及其疾病预防策略的研究[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(9): 25 - 29.

[9] 王专伟, 黄建华, 杨其彬, 等. 感染白斑综合征病毒的斑节对虾免疫酶变化特征[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(9): 1852 - 1854.

[10] 冯宁宁, 孙玉苗, 温荣, 等. 脊尾白虾白斑综合征病毒耐受群体质量要免疫相关酶活性分析[J]. 海洋科学, 2014, 38(3): 75 - 78.

[11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248 - 254.

[12] 朱其建, 戴习林, 邹卫丽, 等. 罗氏沼虾抗病选育群体的抗病性能及其遗传多样性分析[J]. 水产学报, 2013, 37(10): 1468 - 1478.

[13] 黄永春, 艾华水, 潘忠诚, 等. 凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的建立及其抗病特性[J]. 水产学报, 2013, 37(3): 359 - 366.

[14] 黄永春, 艾华水, 殷志新, 等. 第四代凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的抗病及免疫特性研究[J]. 水产学报, 2010, 34(10): 1549 - 1558.

[15] 王专伟. 斑节对虾家系生长、抗病、抗逆性状与免疫酶活性的相关分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.

[16] 张涛. 斑节对虾抗 WSSV 家系筛选[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.

[17] Chen J H, Mai K S, Ma H M, et al. Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(3): 272 - 281.

[18] Sung H H, Lin Y H, Hsiao C Y. Differential immune responses of the green Neon shrimp (*Neocaridina denticulata*) to dipropyl phthalate[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(3): 511 - 515.

[19] Qin Q, Qin S J, Wang L, et al. Immune responses and ultrastructural changes of hemocytes in freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to elevated cadmium[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 106/107: 140 - 146.

[20] Fridovich I. Superoxide dismutases: an adaptation to a paramagnetic gas[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(14): 7761 - 7764.

[21] Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. Aquaculture, 2000, 191: 45 - 52.

[22] 张曼, 宋维彦, 王军. 白斑综合征病毒对日本囊对虾仔虾免疫相关酶活性的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2011, 50(1): 117 - 122.